

⑫ 公開特許公報(A)

昭64-35268

⑬ Int.Cl.⁴

G 01 N 33/543

識別記号

庁内整理番号

D-7906-2G

S-7906-2G

⑭ 公開 昭和64年(1989)2月6日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全7頁)

⑮ 発明の名称 生物特異的な多重分析物アッセイ法

⑯ 特 願 昭63-145944

⑰ 出 願 昭63(1988)6月15日

優先権主張 ⑱ 1987年6月16日 ⑲ スウェーデン(SE) ⑳ 8702511-0

㉑ 発 明 者 エルツキ ソイニ フィンランド国、エスエフ-20540 ツルク、シルピチエ
1 ジエイ。㉒ 出 願 人 ワラツク オサケユイ フィンランド国、エスエフ-20101 ツルク10、ピー、オ
チア ー、ボックス 305

㉓ 代 理 人 弁理士 青 木 朗 外3名

明 細 書

1. 発明の名称

生物特異的な多重分析物アッセイ法

2. 特許請求の範囲

1. 生物特異的な多重分析物アッセイ法であって、

アッセイされるべき種々の分析物を現わす微小球体の種類(カテゴリー)(該種類は、短い崩壊時間を有する蛍光物質の種々の量を含んで成る)を調製し；

生物特異的反応体によりそれぞれの種類の微小球体を被覆し；

懸濁液中に種々の種類の微小球体をブールし；

前記懸濁液にアッセイされるべき分析物を含むサンプルを添加し；

長い崩壊時間を有する蛍光化合物によりラベルされた生物特異的反応体の混合物を前記懸濁液に添加し、分析物と前記ラベルされた反応体及び微小球体関連反応体との間の生物特異的反応を開始し；

微小球体に結合されていないラベルされた反応体の濃度を減ずるために前記懸濁液を希釈し；

微小球体に関連する、短い崩壊時間を有する蛍光物質及び長い崩壊時間を有する蛍光化合物の両者を励起せしめ、蛍光発光を生成し；

前記蛍光発光を電気シグナルに転換し；

短い崩壊時間の蛍光物質に起因する電気シグナルの強さに基づいてそれぞれの微小球体の種類を同定し；そして

長い崩壊時間の蛍光化合物に起因する電気シグナルの強さに基づいてそれぞれの微小球体に対する分析物の濃度を測定することを特徴とするアッセイ法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、生物特異的な多重分析物アッセイ法に関する。

イムノアッセイは、生物特異的なアッセイの十分に確立されたグループであり、そして日常の診断及び研究実験室で現在広く使用されている。現在開発されている生物特異的なアッセイのもう1つの

グループは、DNAハイブリダイゼーションアッセイである。生物特異的アッセイは一般的に、1又はいくつかの生物特異的反応体（たとえば抗体、DNAプローブ）を使用し、そして通常、これらの反応体の1つはラベルされている。現在使用されているラベルは、放射性同位体、酵素、発光及び蛍光ラベルである。

日常の診断においては、多重分析物（多重パートナー）の分析のための必要性が存在する。不運には、現在の方法論は、2又は3よりも多くの同時ラベルの使用を可能にしない。なぜならば、異なったラベルからのシグナルの分光分離が十分に効果的でないからである。異なった放射性同位性ラベル及び蛍光ラベルの発光スペクトルは有意なオーバーラッピングを有し、そして結果的に、それらは必要とされる濃度範囲にわたって種々の分析物の適切な分離を提供しない。

本発明の目的は、生物特異的多重分析物アッセイのための方法論を改良することである。

本発明の方法は：

短い崩壊時間の蛍光物質に起因する電気シグナルの強さに基づいてそれぞれの微小球体の種類を同定し；そして

長い崩壊時間の蛍光化合物に起因する電気シグナルの強さに基づいてそれぞれの微小球体に対する分析物の濃度を測定することを特徴とする。

本発明は、微小球体及び実質的に異なった蛍光崩壊時間有する蛍光ラベルの使用を組合す。多重分析物アッセイは、本明細書においては種類と呼ばれる種々の分析物を現わす種々の微小球体のプールを含んで成る、人工的に製造された微小球体の懸濁液中で行なわれる。微小球体のそれぞれの種類は、最初に特定の反応体（抗体）により被覆され、すなわち微小球体は前記特異的反応体及び生物特異的反応のための固体支持体として機能する。本発明は、短い崩壊時間及び長い崩壊時間の蛍光ラベルを組合す新規の微小蛍光定量の方法論に特に関し、ここで短い崩壊時間のラベルは、異なった分析物を現わすそれぞれ個々の微小球体の種類の同定のために使用され、そして長い崩壊時

アッセイされるべき種々の分析物を現わす微小球体の種類（カテゴリー）（該種類は、短い崩壊時間を有する蛍光物質の種々の量を含んで成る）を調製し；

生物特異的反応体によりそれぞれの種類の微小球体を被覆し；

懸濁液中に種々の種類の微小球体をプールし；

前記懸濁液にアッセイされるべき分析物を含むサンプルを添加し；

長い崩壊時間を有する蛍光化合物によりラベルされた生物特異的反応体の混合物を前記懸濁液に添加し、分析物と前記ラベルされた反応体及び微小球体関連反応体との間の生物特異的反応を開始し；

微小球体に結合されていないラベルされた反応体の濃度を減ずるために前記懸濁液を希釈し；

微小球体に関連する、短い崩壊時間を有する蛍光物質及び長い崩壊時間を有する蛍光化合物の両者を励起せしめ、蛍光発光を生成し；

前記蛍光発光を電気シグナルに転換し；

間のラベルは、生物特異的反応により微小球体に対する特定の分析物の濃度を検出するために使用される。

単一の大きさにされた微小球体は、わずかに親水性特性を有する適切なポリマー材から製造され、そして従って水懸濁のためにひじょうに適切である。その微小球体の表面性質はまた、物理的吸収及び表面でのOH-基の活性化を通しての共有結合により高分子の結合を可能にする（J. Johanson & al., *Journal of Immunological Methods*, 59 (1983) 255~264 ページ）。本発明において、すべての異なった分析物を含むサンプルは、短時間で完全な反応を達成するために、微小球体のプール及び可能なだけ最少の体積（たとえば10~100 μ l）でのラベルされた反応体のプールと共に最初インキュベートされる。微小球体懸濁液における分析物分子とラベルされた反応体との間の平均距離がひじょうに短いために、生物特異的反応の平衡は、インキュベーションの間、急速に達成され、そして結果として、微小球体表面上でラベルされ

た反応体、分析物及び固定された反応体から成る接合体が形成され通常これは当業界において“サンドイッチ”と呼ばれる。インキュベーションの後、懸濁液は、蛍光計により個々の微小球体を分析するために適当に希釈される。十分な数の微小球体が分析され、そしてそれぞれの微小球体からの蛍光シグナルがコンピューターに記録される。

本発明においては、微小粒子表面で生物特異的の反応体に関連する蛍光ラベルの高い検出感度は、ヨーロッパ特許出願85850172.7により詳しく記載されているように、長い崩壊時間蛍光ラベル、たとえばユーロピウム、テルビウム、等のランタノイドキレートの使用に基づかれる。

検出感度は、通常当業界において時間分解蛍光検出と呼ばれる、励起と発光との間の一時的分解によりバックグラウンド蛍光を減じることによって改良される。長い崩壊時間の蛍光ラベルの時間分解蛍光測定法の最っとも最近の開発及び進歩の包括的総説が、Soin: 及び Lövgren (CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry, 第18巻, 第

2版(1987))によって書かれている。時間分解蛍光検出のための装置は、パルスされた光源及びゲート検出器が典型的には組込まれ、その検出器は、励起パルスから一定の遅延時間の後、活性化される。従って短い崩壊時間の蛍光又は散乱は、その寿命がその遅延時間よりも一層短いので、検出器により記録されない。検出器は、サンプル中における長い崩壊時間の蛍光ラベルに対して特異的である長い崩壊時間の発光のみを検出する。

本発明に関するシステムは、上記特徴を兼ね備え、そして本発明の目的は、同じサンプル中における多重分析物のアッセイを行なうために、種々の分析物の種類を現わすそれぞれ個々の微小粒子を同定することである。その同定は、上記のように短い崩壊時間の蛍光の検出に基づかれる。適切な測定システムにおいては、短い崩壊時間及び長い崩壊時間の蛍光が別々に検出され得る。特に、崩壊時間がいくつかの次数の大ききで異なる場合(ナノ秒範囲での有機蛍光材及びマイクロ秒〜ミリ秒範囲でのランタノイドキレート)、強く且つ種

々の短い崩壊時間の蛍光成分は、長い崩壊時間の蛍光成分の検出に対して悪影響を与えない。これは本発明の重要な点であり、そして早く崩壊する蛍光材は、分析物の濃度の決定に対して何の有意な妨害をも与えないで、微小粒子の種類の同定のために使用され得る。微小球体は、ポリマー材と適切な短い崩壊時間の蛍光化合物とを混合することによって製造され得る。ひじょうに短い崩壊時間を有する有機蛍光化合物、たとえば POPOP、ビスM S B等が、いずれかのモノマーに添加され得(たとえば“Theory and Practice of Scintillation Counting”, Ed. J.B. Birks, Pergamon Press, 1967, 321~353 ページに記載のように)、そして固体蛍光材が重合により形成される。微小球体の同定のためには、短い崩壊時間の有機蛍光化合物が、たとえばお互い2のファクターで異なる、実質的に異なる濃度でのモノマーの種々のバッチ中に添加される。

同定シグナルは、ほとんど数 μ 秒での間続く励起により同時に検出され、そして長い崩壊時間の

蛍光ラベルの崩壊時間よりも実質的に短い。同定シグナルレベルへの長い崩壊時間の蛍光ラベルの寄与は、ひじょうに低い。なぜならば、 μ 秒当りの長い崩壊時間の成分の光子発光率はひじょうに低く、そして同定化合物が、長い崩壊時間のラベルよりも一層高い濃度で使用され得るからである。
検光子としてフローサイトメーターの使用

フローサイトメーター (J. Steinkamp, Rev. Sci. Instrum. 55(1984)1375~1400 ページ) は、固定支持体として微小球体を使用するイムノアッセイのために使用され得ることが知られている (P. J. Lisi 他など, Clinica Chimica Acta, 120(1982) 171~179 ページ)。この方法においては、抗原被覆又は抗体被覆の微小球体(直径1~50 μ m)が、一般的に使用されるいずれかのイムノアッセイ型、すなわちコンペティティブアッセイ、二重抗体“サンドイッチ”、等において、サンプル及び蛍光ラベルされた抗原又は抗体と反応せしめられた。その懸濁液が、フローサイトメーター中に洗浄しないで導入され、そして微小球体は、レー

ザー光線を通過して狭い流れの中を流れた。

サイトメーターが微小球体からの蛍光光及び分散光を同時に測定するなら、微小球体関連の蛍光のみを測定することが可能である。結果的に、この方法論の特別な利点は、結合された及び遊離状態のラベルされた化合物の顕微鏡分離が必要とされないことである。肉眼的分離は、顕微鏡的レベルで、蛍光関連（フリー）溶液と蛍光関連（結合性）粒子とを識別するフローサイトメーターの能力により回避された。その識別は、直径1〜5 μ mの微小球体のために最も有効であり、ここで高い蛍光バックグラウンド媒体中の球体及び緩衝液媒体中の球体は、粒子当りほぼ同じ蛍光強度を示した。

多重分析物イムノアッセイのためにフローサイトメーターを用いる可能性は、T.M. McHugh & など、J. Immunol. Methods 95(1986) 57〜61ページにより論議され、ここで種々の大きさの微小球体が固体支持体として使用され、そして種々の分析物に関連する微小球体の同定は、微小球体の大き

するからである。

上記特徴を組み込む装置は、たとえば第1図に例示されているようにして構成され得る。この例においては、ユーロピウムキレートが長い崩壊時間のラベルとして使用され、そして PPOPが短い崩壊時間の蛍光物質、すなわち同定物質として使用されると思われる。ユーロピウムキレート及び PPOPの励起波長は、一般的に 390nm〜360nmの同じ範囲に存在する。窒素レーザー又はゼノンフラッシュランプからの 337nmの波長の発光が、励起のために最適である。発光の波長は、ユーロピウムのために 613nm及び PPOPのために約 400nmである。励起及び発光スペクトルは第2図に示される。

微小粒子1の懸濁液及びシース流体2は、シースフローノズル3を通して薄積層フロー4中に動く。ここで懸濁液は、薄積層フロー4中の点8に焦点を合わせられた、連続した光源5、たとえば HeNe-レーザーからの波長 633nmでの光線5によりまず照射される。633nmに対して敏感な光子検

きの分析に基づかれた。これは実行できるものであることが見出された。なぜならば、フローサイトメーターは、大きさに基づいて粒子を正確に検出でき、そして他の大きさの微小球体からの妨害なしに、既知の微小球体の集団を同定し、そして蛍光を測定することが可能であるからである。

フローサイトメーターにおいて、短い崩壊時間の蛍光と長い崩壊時間の蛍光との間の一時的な分解の概念は、上記のようにゲート検出器の使用に基づかれない。励起と発光との間の一時的な分解は、励起及び検出の焦点に対するサンプルの高速度移動により達成され得る。この概念においては、スウェーデン特許出願第 8604434-4により詳しく論議されているように、励起及び発光の焦点が、次のような方法で簡単に分離される。すなわち、分散及び短い崩壊時間の蛍光からのシグナルは、検出されないが、しかしいずれかの長い崩壊時間の蛍光ラベルからのシグナルは検出され得る。なぜならば、サンプルが焦点に対して高速度で動く場合、それらが“アフターグロウ(after glow)”

出器7を、点8に焦点を合わせ、そしてランダムに侵入する微小粒子1から散乱する光子をモニターするために使用する。それぞれの微小粒子1は検出器7中でシグナルを発生し、そしてこのシグナル薄積層フロー4中の点10に焦点を合わせられたフラッシュランプ又はパルスレーザー9を作動させるために使用される。そのパルスレーザー9は、337nmの波長で微小粒子中の両蛍光物質、すなわち同定化合物及びランタニドキレートの励起のために使用される。検出器7からのシグナルはまた、コンピューター11も活性化する。400nmの波長に対して敏感なゲート光子検出器12は、点10に焦点を合わせられ、そしてそれぞれの微小粒子1の有機蛍光化合物からの短い崩壊時間のシグナルの振幅を測定する。次に、この振幅測定は、コンピューター11による粒子の同定のために使用される。検出器13は、614nmの波長で長い崩壊時間の蛍光を測定する。その検出器13は、点10から短い距離d x下流で点14に焦点を合わせられる。その短い距離は次の式で表わされる：

$dx = v \cdot td$ (ここで v は薄積層フロー4の速度であり、そして t は遅延時間である)。ゲート15は、遅延時間 t_d の後、計数時間 t_g のために活性化される。それらの遅延時間 t_d 及び計数時間 t_g は、コンピュータ11により制御され、そして最っとも高いシグナル：バックグラウンド比のために最適化され、そして長い崩壊時間の蛍光ラベルの崩壊時間に依存する。このシステムの計数速度は、パルス光源9の最大パルス周波数及び長い崩壊時間のラベルからのシグナルの計数時間 t_g に依存する。最少の光パルス期間よりも短い期間内で同時に起こる微小粒子からのシグナルは、電気的に拒絶され得る。コンピュータ11は、それぞれのパラメータのために別々に微小粒子からの光シグナルを集積する。それぞれの分析物の適切な標準サンプルを用いて、そのシステムは、濃度単位のために校正され得る。

長い崩壊時間の蛍光ラベルの選択は、装置のシステムパラメータに影響を及ぼす。特別な注意が、光源から検出器13への迷光の漏れのために

払われるべきである。点8及び14並びに検出器を通る光の分離を一点に集中するための良好な受光器は、この結果により引き起こされるバックグラウンドを減じる。

定常マイクロ蛍光測定検光子の使用

フローサイトメータシステムは、比較的高価であり、そしてそれらの光システム及び流体力学的システムは、機械的に複雑であり、そして敏感である。しかしながら、微小粒子の分析はまた、定常状態で又は停止フローシステムで行なわれ、そしてこのタイプのアプローチは、安価であり、そしてより強力である。定常の装置によりアプローチは、希釈された微小粒子懸濁液が反応管からポンプにより押し上げられる薄い穴中の微小粒子の顕微鏡観察の使用に基づく。微小粒子の懸濁液はまず、ひじょうに早い速度でスキャンされ、そして微小球体及びそれらの位置の同定並びにそれらの分析物の種類の決定が、短い崩壊時間の蛍光の検出に基づいて行なわれる。微小粒子中の分析物濃度の検出が、長い崩壊時間の蛍光のシグナ

ルの長さの測定を生ぜしめる。十分な数のランダムに位置する微小粒子が同定され、そして所望する統計学的精密度のために十分な量の情報を得るために分析される。

励起光源は、パルス光源又は定光源のいずれかであることができる。パルス光源を用いる場合、サンプルのそれぞれのスキャン点は、1又はいくつかの光パルスに照射され、そして検出器及び関連する光子計数電子機器が短い崩壊時間及び長い崩壊時間の蛍光の両者を別々に検出するために組込まれる。

定光源が同時焦点スキャンマイクロ蛍光測定法に使用される場合、短い崩壊時間の蛍光と長い崩壊時間の蛍光との間の一時的分解の概念が次の方法で達成され得る。励起及び発光の焦点を次のような方法で短い間隔で分離する。すなわち、その方法とは、短い崩壊時間の蛍光ラベルからのシグナル及び長い崩壊時間の蛍光ラベルからのシグナルを、励起ビームがサンプルに関して高速度で動く場合、異なった時間で検出することができること

である。この概念は、スウェーデン特許出願第8604434-4号にさらに詳しく記載されている。

マイクロ蛍光測定分析（及びフローサイトメータ）は、微小球体関連の蛍光と溶液関連の蛍光との間を区別することができる。なぜならば、希釈懸濁液における顕微鏡的焦点でのそれぞれの濃度がひじょうに異なるからである。この検出概念は、フリー及び結合画分の適切な分離を提供するが、しかし必要ならば、それは通常の分離方法（洗浄、濾過、遠心分離、等）を用いてより効果的にされ得る。

種々の蛍光シグナルの検出は、適切なコンピュータにより制御された自動ビデオ顕微鏡 (Video Microscopy, ed. Shinya Inoue, Plenum Press, 1986) 及びスキャン顕微鏡により行なわれ得る。そのスキャン顕微鏡はまた、感度及び精度を改良するために励起及び発光のために同時焦点光学系を備えている。(G.J.Brakenhof & など, J. Microscopy, 117(1979)219 ~ 232 ページ)。他方、アパーチュアは、微小粒子の直径に従って、

適度に選択され得、そして螢光発光シグナルのスキューン、単一の光子モードで作動することができ、適切なイメージング検出器を用いて行なわれ得る。そのような検出器は、たとえばマイクロチャンネルプレートイメージ増幅器及び帯電結合イメージング装置 (charge coupled imaging devices, CCD) から構成され得る。帯電結合装置は、短い崩壊時間の螢光と長い崩壊時間の螢光との間を区別するために、時間分解操作の目的で導入され得る (Video Microscopy, ed. Shinya Inoue を参照のこと)。CCDからのイメージの分析は、コンピュータにより行なわれ得る。

4. 図面の簡単な説明

本発明の次の添付図面によりさらに詳しく説明される。

第1図は、本発明の方法を行なうための装置の態様を図的に示し、そして

第2図は、励起スペクトル及び発光スペクトルを示す。

図面中の数字の説明：

- 1 : 微小粒子 ; 2 : シース流体 ; 3 : シースフローノズル ; 4 : 薄積層フロー ; 5 : 光線 ; 6 : 光源 ; 7 : 光子検出器 ; 9 : パルスレーザー ; 11 : コンピューター ; 12 : ゲート光子検出器 ; 13 : 検出器 ; 15 : ゲート。

特許出願人

ワラック オサケユイチア

特許出願代理人

弁理士 青 木 朗

弁理士 石 田 敬

弁理士 山 口 昭 之

弁理士 西 山 雅 也

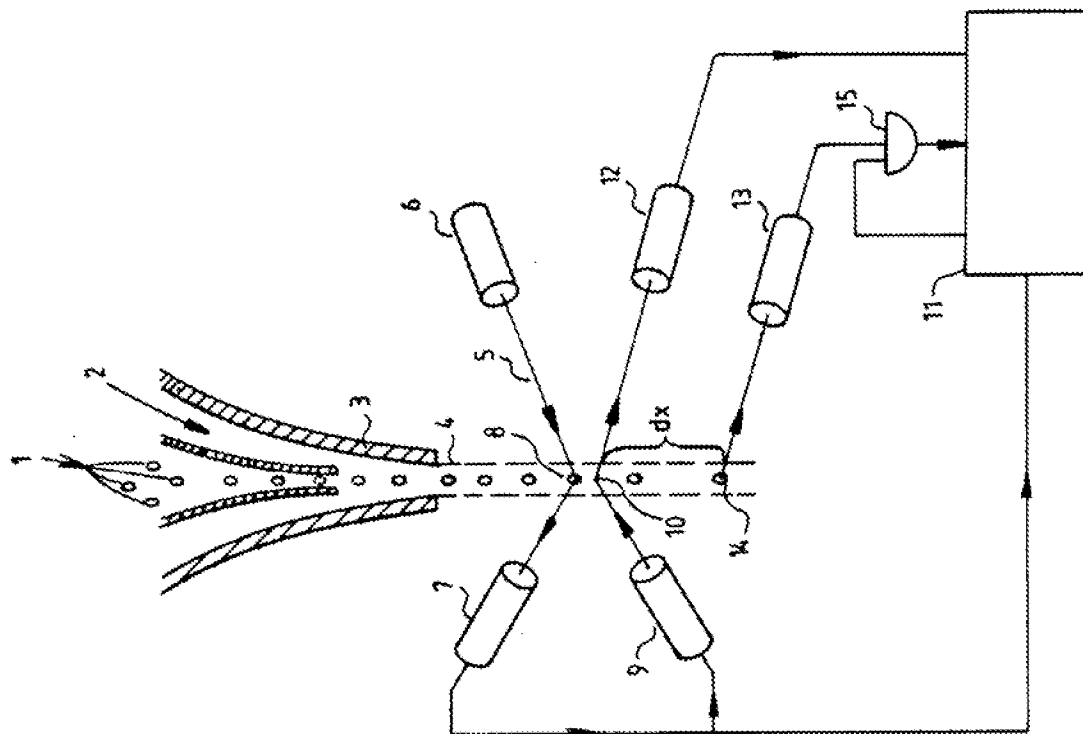


Fig. 1

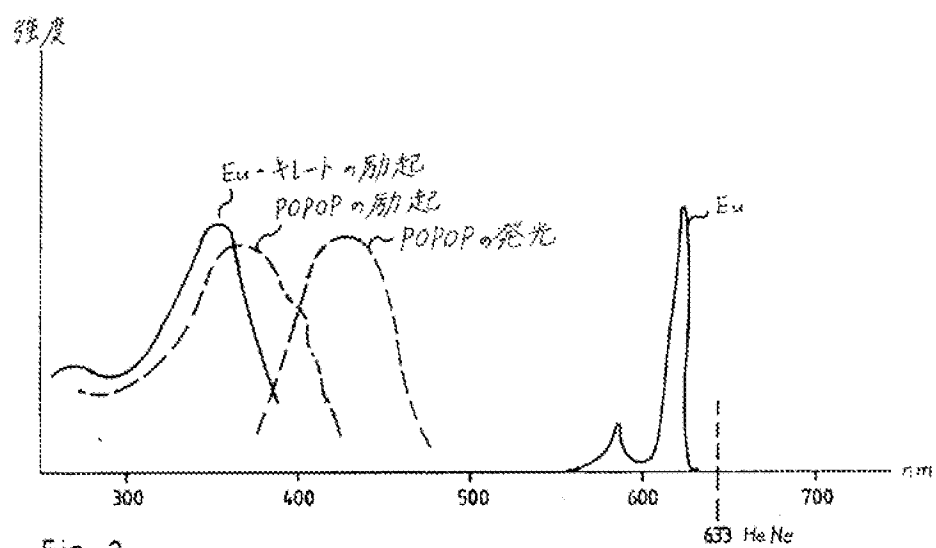


Fig. 2